

Aus dem
Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Chirurgische Klinik
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel)

**Molekularer Nachweis und direkte Analyse der frühen systemischen
Tumorerkrankung: klinische Implikationen am Beispiel des
Ösophaguskarzinoms.**

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Experimentelle Chirurgie
des Fachbereichs Medizin der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, vorgelegt
von
Dr. med. Nikolas Hendrik Stoecklein
geboren in Heidelberg
2007

Inhaltsverzeichnis

<i>1. Einleitung</i>	<i>3</i>
<i>2. Eigene Ergebnisse und Diskussion</i>	<i>5</i>
2.1 Nachweis, Ausbreitungsmuster und prognostische Bedeutung lymphatisch disseminierter Tumorzellen beim Ösophaguskarzinom (Anhang 1)	5
2.2 Molekulare Charakterisierung der minimalen residualen Tumorerkrankung (Anhang 2)	8
2.3 Validierung und Optimierung der SCOMP Technologie zur Analyse von archiviertem formalinfixiertem Gewebe (Anhang 3)	12
2.4 Genetische Analysen disseminierter Tumorzellen beim Ösophaguskarzinom (Anhang 4)	16
2.5 Nachweis und mögliche klinische Bedeutung zirkulierender freier Tumor-DNA beim Ösophaguskarzinom (Anhänge 5 und 6).....	27
<i>3. Zusammenfassung</i>	<i>31</i>
<i>4. Abkürzungen</i>	<i>33</i>
<i>5. Danksagung</i>	<i>34</i>
<i>6. Literatur</i>	<i>36</i>
<i>7. Anhang</i>	<i>43</i>

“A deep understanding of the process leading to the formation of metastasis is surely critical for the future development of cancer cures. For the moment, however, the questions and unresolved issues ... show how little we understand about the details of the metastatic cascade and why, in the eyes of many, invasion and metastasis represent the major challenge of basic cancer research.”

Robert Weinberg (2006)

1. Einleitung

Das Ösophaguskarzinom gehört zu den soliden malignen aggressiven Tumoren mit schlechter Prognose, da sich bereits früh im Krankheitsverlauf Metastasen entwickeln. Die fünf Jahres-Überlebensrate betroffener Patienten ist daher trotz moderner Operationsverfahren und multimodaler Therapiekonzepte mit 20%-30% gering [1-11]. Die meisten Ösophaguskarzinompatienten mit klinisch lokal begrenzter Erkrankung, deren Tumor mit kurativer Intention operativ entfernt wurde, entwickeln nach Monaten oder Jahren Metastasen [7, 9, 11, 12]. Dabei ähnelt sich das Metastasierungsverhalten von Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom, den beiden häufigsten histologischen Typen des Ösophaguskarzinoms, obwohl sie sich ätiologisch, epidemiologisch und biologisch voneinander unterscheiden [7, 11, 13, 14]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weisen bereits bis zu 14% der pT1-Tumore, sowie annähernd 75% der pT4-Tumore histopathologisch nachgewiesene Lymphknoten-Metastasen auf. Darüber hinaus kommt es bei etwa 50% der Patienten, die mit kurativer Intention operiert worden sind - d.h. bei Patienten mit einer lokoregionär beschränkten Erkrankung (UICC Stadien I-III) [15] – innerhalb von drei Jahren zu einem Tumorrezidiv. Bis zu 85% dieser Patienten versterben tumorbedingt innerhalb von fünf Jahren nach dem Eingriff [1-4, 7, 16].

Die Überlebenschancen der betroffenen Patienten werden auch durch die aktuell verfügbaren neoadjuvanten und adjuvanten zytotoxischen Therapien nicht nachhaltig verbessert [1-3, 5-7].

Insgesamt legen die klinischen Daten von Ösophaguskarzinompatienten nahe, dass eine systemische Tumorzellaussaat bereits zum Operationszeitpunkt

erfolgt ist, welche mit konventioneller Routinediagnostik nicht erfasst werden kann. Diese, nach der Operation zurückgelassene, minimale Resterkrankung bildet dann offensichtlich den Ausgangspunkt für die spätere Entwicklung letaler Metastasen.

Hieraus ergeben sich zwei wichtige Problemstellungen. Zum einen reichen die histopathologischen Parameter offenbar nicht aus, um präzise abschätzen zu können, bei welchen Patienten bereits eine disseminierte Krebserkrankung vorliegt und damit ein hohes Risiko für Metastasen besteht. Zum anderen sind die verfügbaren systemischen Therapien nicht in der Lage, das metastatische Auswachsen der bereits zum Operationszeitpunkt disseminierten Tumorzellen effektiv zu unterdrücken.

Der Schlüssel zur Lösung beider Problemstellungen liegt möglicherweise in der Analyse der minimalen residualen Tumorerkrankung. Zum einen könnte der Nachweis der minimalen Resterkrankung helfen, Patienten frühzeitig und gezielt systemischen Therapien zuzuführen. Zum anderen würde die direkte Charakterisierung der frühen, klinisch okkulten Systemerkrankung den Zugang zu effektiven therapeutischen Zielstrukturen ermöglichen, da sie das eigentliche Ziel adjuvanter Therapien darstellt. Wir haben daher zunächst Versuche gestartet, mittels molekularer Methoden bei Ösophaguskarzinompatienten die frühe systemische Tumorerkrankung auf zellulärer Ebene und auf DNA-Ebene nachzuweisen, um zu testen, ob es sich hierbei um geeignete prognostische Marker für die Tumorprogression handelt. Neueste technologische Fortschritte auf dem Gebiet der Einzelzellanalyse haben es uns dann weiterhin ermöglicht, die disseminierten Tumorzellen der frühen systemischen Erkrankung nicht nur

nachzuweisen, sondern auch umfassend genetisch zu charakterisieren, um direkt an den Zielzellen adjuvanter Therapien neue therapeutische Zielstrukturen aufdecken zu können. Da es sich bei den disseminierten Tumorzellen um die potentiellen Vorläuferzellen der Metastasen handelt, sollten die hier definierten therapeutischen Zielstrukturen höchste Aussicht auf eine erfolgreichere Behandlung von Ösophaguskarzinompatienten haben.

2. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Die dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrunde liegenden Arbeiten beschreiben den molekularen Nachweis und die direkte genetische Charakterisierung der frühen systemischen Erkrankung beim Ösophaguskarzinom und diskutieren die mögliche klinische Bedeutung dieser Analysen. Ein Schwerpunkt der Arbeiten liegt bei der genetischen Charakterisierung von früh-disseminierten Tumorzellen, welche nicht nur von klinischem Interesse ist, sondern auch neue Einblicke in die Biologie der Disseminierung und frühen Metastasierung ermöglicht.

2.1 Nachweis, Ausbreitungsmuster und prognostische Bedeutung lymphatisch disseminierter Tumorzellen beim Ösophaguskarzinom (Anhang 1, [17])

Einer der stärksten konventionellen prognostischen Parameter beim Ösophaguskarzinom ist die histopathologisch nachgewiesene Lymphknotenmetastasierung [7, 18]. Es ist jedoch festzustellen, dass bis zu 70% der Patienten ohne nachweisbare regionale Lymphknotenmetastasen (pN0) innerhalb von fünf Jahren nach der Operation tumorbedingt versterben [7]. Dies ist ein starker Hinweis, dass beim Ösophaguskarzinom lymphatisch

gestreute Tumorzellen der histologischen Routineuntersuchung entgehen. Tatsächlich konnten verschiedene Arbeitsgruppen mit Hilfe von Immundetektionsverfahren isolierte Tumorzellen in Lymphknoten nachweisen, welche in der Routinediagnostik als tumorfrei bewertet worden waren [7, 19-24]. Der Nachweis dieser Zellen war in einigen Studien prognostisch hoch relevant. Diesen ersten Ergebnissen zufolge, schien bei Ösophaguskarzinomen eine möglichst systematische und vollständige Entfernung der regionalen Lymphknoten erforderlich. Dennoch war zu Beginn unserer Untersuchungen das Ausmaß der Lymphknotenentfernung im Rahmen der Ösophagektomie nach wie vor Thema kontroverser Diskussionen [16, 25-43]. Insbesondere wurden minimal invasive Verfahren zur Identifikation des Sentinel-Lymphknotens (Wächterlymphknotens) vorgeschlagen [44-48], was eine lineare Tumorzell dissemination - bzw. Metastasierung - ohne das Überspringen von Lymphknotenstationen voraussetzt. Systematische Studien zur Ausbreitung von Lymphknotenmetastasen beim Ösophaguskarzinom waren jedoch bis dato nicht verfügbar.

Wir haben daher in einer grundlegenden Studie das Ausbreitungsmuster der histopathologisch erfassbaren Lymphknotenmetastasen analysiert und bei dieser Fragestellung als wesentlichen Aspekt auch die früh disseminierten, nur immunhistochemisch darstellbaren, Tumorzellen berücksichtigt [17]. Für diese prospektive Untersuchung wurden zunächst anhand eines Kartierungssystems die Lymphknotenstationen in sechs aufeinander folgende, definierte Regionen eingeteilt. Im Rahmen der Studie wurden dann 1584 systematisch entfernte und entsprechend kartierte Lymphknoten von 86 Ösophaguskarzinompatienten

analysiert. Achthundert dieser Lymphknoten waren makroskopisch unauffällig und wurden bereits intraoperativ geteilt, wobei ein Teil der histopathologischen Routineuntersuchung zugeführt wurde. Dabei waren 540 dieser Lymphknoten als tumorfrei klassifiziert worden. Die andere Hälfte dieser 540 Lymphknoten wurde mittels immunzytochemischer Detektion unter Verwendung des anti-EpCAM Antikörper Ber-EP4 auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Anschließend erfolgte eine Analyse, ob sich die Lymphknotenmetastasen und die EpCAM positiven Zellen linear entlang der sechs Lymphknoten-Kompartimente ausbreiten oder eine bzw. mehrere der sechs Kompartimente überspringen. Weiterhin wurde die prognostische Bedeutung überprüft.

Mit unserer Analyse konnten wir nun erstmals zeigen, dass die Lymphknotenmetastasierung beim Ösophaguskarzinom nicht linear erfolgt, sondern dass ein Überspringen von Lymphknotenstationen („Skipping“) häufig ist. Bei 43% der 44 Patienten mit histopathologisch verifizierten Lymphknotenmetastasen konnte das Überspringen von einer oder von mehreren Lymphknotenstationen beobachtet werden. Durch die Analyse der disseminierten Tumorzellen war weiterhin feststellbar, dass das Überspringen von Lymphknotenstationen beim Ösophaguskarzinom offenkundig sehr früh erfolgt, da dies auch bei 69% der EpCAM positiven disseminierten Tumorzellen bei Patienten im Stadium pN0 beobachtet wurde. In der Überlebensanalyse war das Überspringen von Lymphknotenstationen kein unabhängiger prognostischer Faktor und ist daher auch nicht als Ausdruck einer aggressiveren Tumorerkrankung zu interpretieren. Es ist eher ein Indikator für die komplexe ösophageale lymphatische Anatomie, die ohne eine umfangreiche

systematische Lymphknotenentfernung nur ungenügend erfasst werden kann. Das Sentinel-Lymphknoten Konzept scheint auf Grund der gewonnenen Daten bei lokal begrenzten Ösophaguskarzinomen nicht anwendbar zu sein.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis war der starke, unabhängige prognostische Einfluss von EpCAM positiven Zellen, welche wir bei 62% der pN0 Patienten nachweisen konnten. Zusammenfassend weisen die gewonnenen Daten darauf hin, dass eine ausgedehnte Lymphknotendisektion, kombiniert mit immunzytochemischem Nachweis disseminierter Tumorzellen, zu einem verfeinerten Tumorstaging und damit zu individualisierten Therapiekonzepten führen könnte.

2.2 *Molekulare Charakterisierung der minimalen residualen Tumorerkrankung (Anhang 2, [49])*

Obwohl disseminierte Tumorzellen beim Ösophaguskarzinom, wie auch bei vielen anderen Tumorentitäten, einen signifikanten prognostischen Einfluss haben, gehören sie zu den seltensten Zellen überhaupt [18, 24, 50, 51]. Über alle Tumorentitäten hinweg, werden diese mit einer Frequenz von 10^{-5} bis 10^{-6} normaler Knochenmarkszellen bei 30-40% der Krebspatienten mit lokal begrenzter Erkrankung detektiert. In Lymphknotengewebe, mit einer Detektionsfrequenz von 40-60%, etwas häufiger. Diese Seltenheit erschwert die weitergehende Analyse disseminierter Tumorzellen und begründet das geringe Wissen über die Biologie dieser Tumorzellpopulation, die so wichtig für die systemische Progression zu sein scheint. Ein signifikanter Fortschritt für das Forschungsgebiet war die Entwicklung einer robusten Einzelzell-PCR (SCOMP), mit der das gesamte Genom einzelner Zellen global und

repräsentativ amplifiziert werden kann [52]. Die mit dieser Adapter-Linker PCR erzeugten Amplifikate ermöglichen dann die weitere, umfassende genetische Analyse von Einzelzellgenomen, wie z.B. die komparative genomische Hybridisierung (CGH). Die CGH ist eine zytogenetische Methode, mit der das gesamte Genom auf DNA-Gewinne und -Verluste untersucht und dann den entsprechenden chromosomalen Regionen zugeordnet werden kann. Zuvor waren solche umfassenden Analysen einzelner disseminierter Tumorzellen unmöglich und deren Genetik kaum bekannt.

Nach vorherrschender Auffassung werden Disseminierung und Metastasierung als späte Ereignisse der Tumorprogression eingeordnet, so dass bei den disseminierten Tumorzellen von einer selektierten, homogenen Zellpopulation ausgegangen werden musste. Wir wollten nun mit den Möglichkeiten der neuen Einzelzell-CGH Technologie überprüfen, inwieweit es sich bei den potentiellen metastatischen Vorläuferzellen tatsächlich um eine genetisch bereits selektierte Zellpopulation handelt [49]. In diesem Falle sollten die genomischen Veränderungen mehrerer disseminierter Tumorzellen innerhalb eines Patienten einander sehr ähnlich sein.

Für diese Analyse konnten wir nur solche Patienten auswerten, bei denen mindestens zwei disseminierte Tumorzellen detektiert worden waren. Hierfür haben wir für mononukleäre Zellen angereicherte Knochenmarksaspirate und Blutproben, sowie Einzelzellsuspensionen aus disaggregierten Lymphknoten von 525 Krebspatienten (304 mit Mamma-Karzinom, 115 mit gastrointestinalen Karzinomen und 106 mit Prostatakarzinom) immunzytochemisch auf disseminierte Tumorzellen hin untersucht. Insgesamt wurden bei 27% der

Patienten disseminierte Tumorzellen nachgewiesen, wobei 14% aller getesteten Präparate (n=71) zwei oder mehr Zellen enthielten. Die detektierten Zellen wurden via Mikromanipulation isoliert, das Genom der Zellen global amplifiziert und anschliessend mit CGH bezüglich chromosomaler DNA-Gewinne und -Verluste untersucht. Zellen die in der CGH keine Veränderungen aufwiesen wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen, so dass insgesamt 115 Zellen von 42 Patienten zur Verfügung standen. Für die Ähnlichkeitsanalyse der Genome wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Patienten mit klinisch manifester Fernmetastasierung (UICC Stadium M1) getrennt von Patienten ohne Fernmetastasen (UICC Stadium M0) analysiert.

Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchung war der Befund einer ausgeprägten genetischen Heterogenität disseminierter Tumorzellen bei Patienten, die keine klinischen Fernmetastasen (Stadium M0) aufwiesen (Abbildung 1). Im Gegensatz dazu war zwischen Zellen von Patienten mit Fernmetastasen (Stadium M1), ein hoher Verwandtschaftsgrad zu beobachten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Des Weiteren wiesen Zellen von M1 Patienten, verglichen mit Zellen von M0 Patienten, eine signifikant höhere Anzahl genomischer Veränderungen auf. Bei einigen Patienten konnten über längere Zeiträume auch wiederholt Knochenmarkspunktionen durchgeführt werden. Interessanterweise waren die oben genannten Befunde zu verschiedenen Zeitpunkten stabil. Die disseminierten Tumorzellen von Ösophaguskarzinompatienten im UICC Stadium M0 bildeten bezüglich ihrer CGH Veränderungen eine Ausnahme, da sie untereinander – ähnlich wie M1 Patienten – einen hohen Verwandtschaftsgrad aufwiesen. In nachfolgenden

Sequenzanalysen des Tumorsuppressorgens TP53 fand sich jedoch bei diesen Tumorzellen eine ausgeprägte Heterogenität auf Ebene der Punktmutationen.

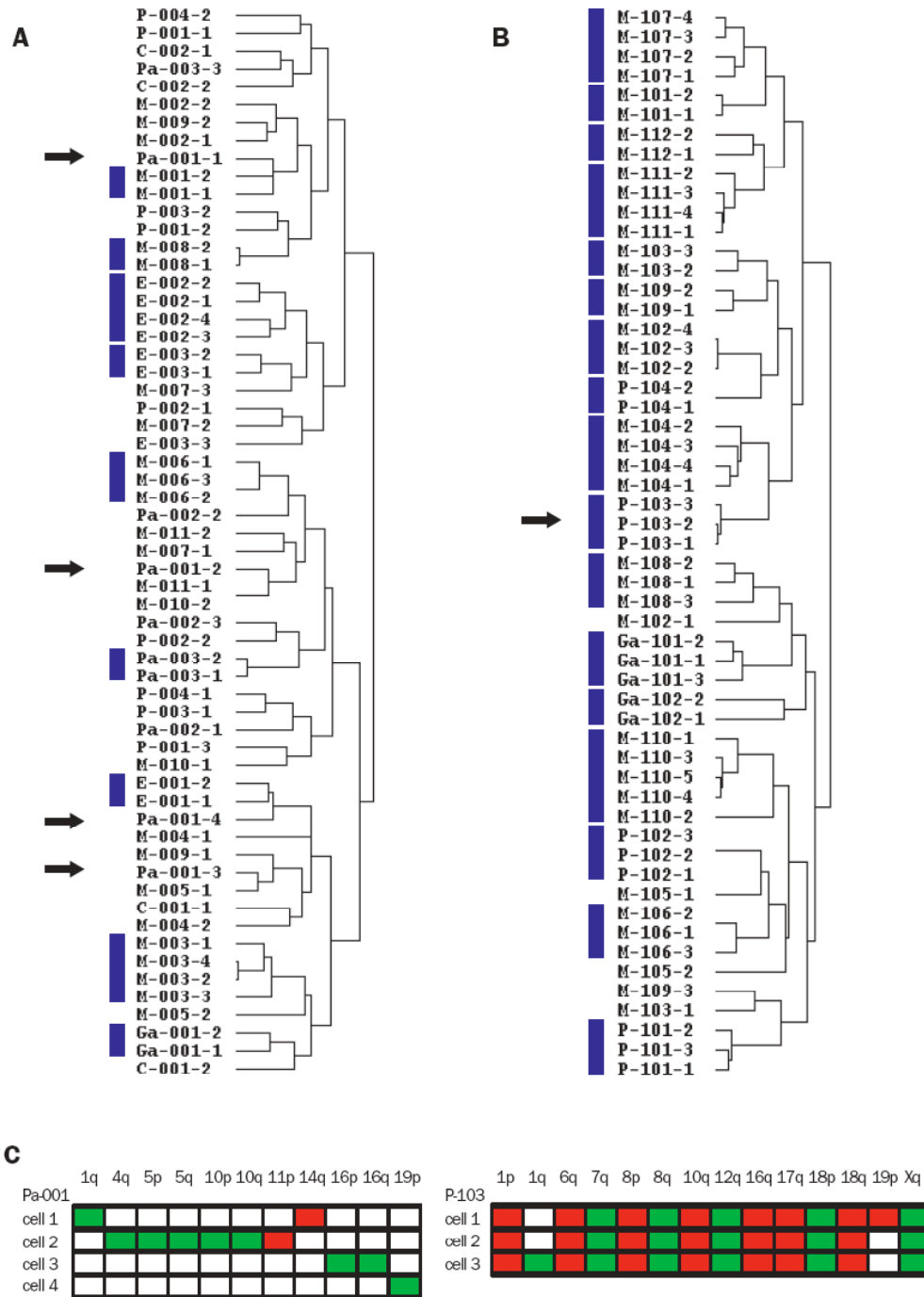


Abbildung 1: Dendrogramm minimal residualer Tumorzellen (A) und disseminierter Tumorzellen mit manifesten Metastasen (B). Die blauen Balken kennzeichnen die Fälle, die in einer Verzweigung des Dendrogramms gruppiert wurden. Die mit E bezeichneten Fälle sind Ösophaguskarzinome. C: Beispiele für die Aberrationen der CGH Analyse. Die entsprechenden Fälle sind im Dendrogramm mit Pfeilen gekennzeichnet.

Insgesamt gaben die Daten unserer Studie einen ersten Einblick in die Genomik potentieller Vorläuferzellen von Metastasen. Die Daten weisen darauf hin, dass der Entstehung von Metastasen offensichtlich eine genetisch variantenreiche Zellpopulation voraus geht, aus der die für die Metastasierung am besten geeigneten Klone selektiert werden. Offen bleibt jedoch die Frage, ob die ausgeprägte genetische Heterogenität der disseminierten Tumorzellen auf einen polyklonalen Ursprung der Zellen zurückzuführen ist, oder ob die genetische Instabilität nach Verlassen des Primärtumors hierfür verantwortlich zeichnet. Angesichts der Komplexität der Veränderungen, scheinen die häufig angewendeten adjuvanten Monotherapien zur Unterdrückung des metastatischen Auswachsens disseminierter Tumorzellen ungeeignet zu sein, da aus einer solch variantenreichen Zellpopulation leicht Klone mit Resistenzen selektiert werden können. Unsere Studie machte auch deutlich, dass die disseminierten Tumorzellen, als die eigentlichen Zielzellen von adjuvanten Therapien, bei der Zielstruktursuche wie auch für die klinische Planung adjuvanter Therapien berücksichtigt werden müssen.

2.3 *Validierung und Optimierung der SCOMP Technologie zur Analyse von archiviertem formalinfixiertem Gewebe (Anhang 3, [53])*

Ein weiterer wichtiger Aspekt, neben der verwandtschaftlichen Analyse von disseminierten Tumorzellen untereinander, ist die Untersuchung über deren klonale Beziehung zum Primärtumor. Im Falle eines globalen Amplifikationsschrittes wie SCOMP ist für solche vergleichenden Untersuchungen die Methodengleichheit des Amplifikationsverfahrens zu gewährleisten. Da das Primärtumorgewebe in vielen Fällen nur als

formalinfixiertes und paraffineingebettetes Gewebe (FFPGE) aus Archiven zur Verfügung steht, musste das SCOMP Protokoll, ursprünglich für die Analyse frischer Einzelzellen entwickelt, entsprechend getestet und angepasst werden [53].

Ein Schwerpunkt bei den Testreihen bildete der Vergleich mit der *Degenerate Oligonucleotide Primed*-PCR (DOP-PCR), der bislang dominierenden globalen Amplifikationsmethode für CGH-Untersuchungen von wenigen Zellen als Ausgangsmaterial [54-57]. Die untere Zellzahl-Grenze wurde in der Literatur für die DOP-PCR mit 1000-2000 aus FFPGE isolierten Zellen angegeben [58], ein Wert der bei den eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte.

Die in unseren Testreihen herausgearbeiteten Möglichkeiten von SCOMP waren der DOP-PCR Methode deutlich überlegen. So war nach Amplifikation mit SCOMP eine korrekte CGH bereits mit 20 Zellkernen möglich, die zuvor aus einem sieben Jahre alten histopathologisch unauffälligen Lymphknoten isoliert worden waren. Vergleichbar geringe Zellzahlen als Ausgangsmaterial konnte für Lasermikrodissektiertes FFPGE demonstriert werden. Auch hochauflösende genetische Untersuchungen, wie LOH Analysen, waren an Amplifikaten weniger Zellen aus FFPGE möglich. LOH Analysen an 18 Mikrosatellitenmarkern konnten ohne artifiziellen Allelverlust bereits im Bereich von 60-160 Zellen durchgeführt werden (Abbildung 2). Als entscheidenden Faktor für eine erfolgreiche Amplifikation aus wenigen FFPGE Zellen identifizierten wir das Lagerungsalter der Gewebestücke. Junge Gewebestücke wiesen eine geringere DNA-Degradation auf als FFPGE Blöcke, die über mehrere Jahre archiviert wurden, und konnten daher erfolgreicher amplifiziert werden (Abbildung 2).

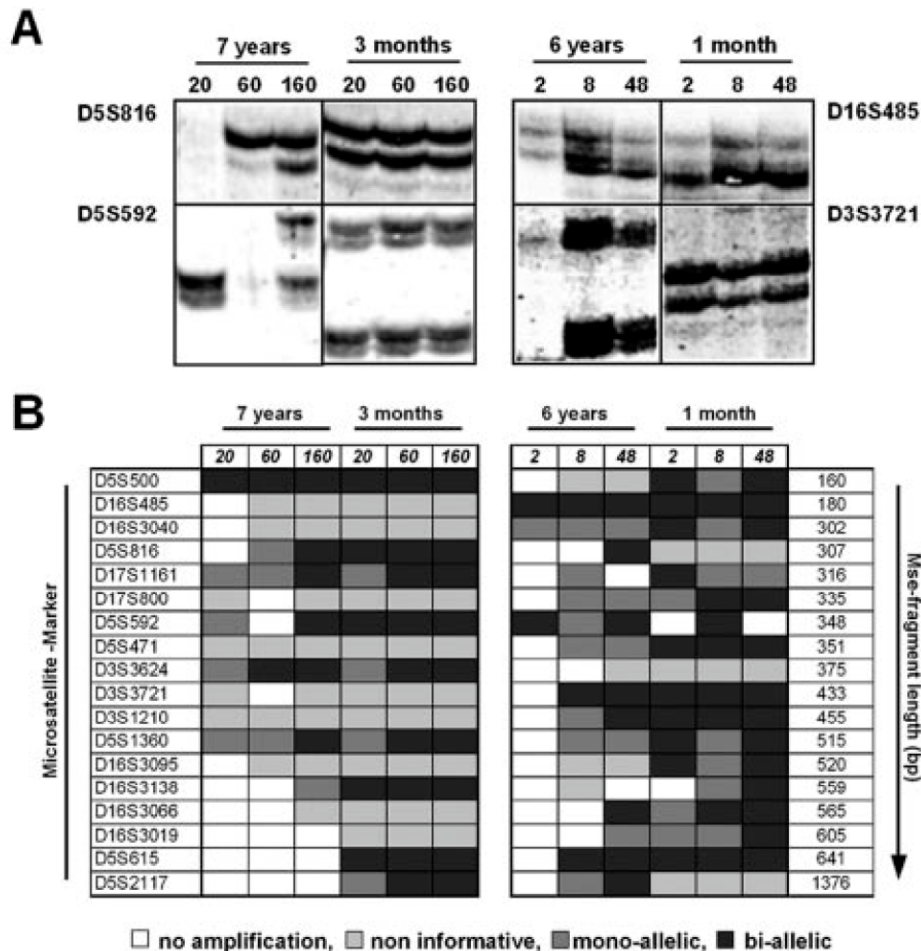


Abbildung 2: Analyse des Verlusts der Heterozygotie (LOH) bei 18, nach MseI-Fragmentlängen ausgewählten, Mikrosatelliten-Markern. A und B: isolierte Zellkerne (links) und mikrodisektiertes Gewebe (rechts) wurden nach SCOMP Amplifikationen mit PCR für Mikrosatelliten-Marker untersucht (7 years, 3 months, 6 years, 1 month: unterschiedliches Einbettalter der untersuchten FFPGE Blöcke). Die Zahlenfolgen in den Überschriften in (A) und (B) beschreiben die untersuchte Zellkernanzahl (links) bzw. rechts das untersuchte mikrodisektierte Areal (2: 2000 μm^2 ; 8: 8000 μm^2 ; 48: 48000 μm^2). A: Beispiele für mittels Polyacrylamidgel analysierter Mikrosatelliten-Marker von isolierten Zellkernen (D5S500 und D5S592), sowie von mikrodisektiertem Gewebe (D16S485 und D3S3721). B: Ergebnisse aller untersuchten Mikrosatellitenmarker aufgelistet nach steigender MseI-Fragmentlänge.

Den Vorteil der CGH Analyse weniger Zellen bei genetisch heterogenen Primärtumoren konnte an einem fünf Jahre altem FFPGE Block eines zytogenetisch gut charakterisierten ösophagealen Adenokarzinoms demonstriert werden. Da die CGH eine vergleichende molekulargenetische

Methode ist, werden Veränderungen, die bei weniger als 50% der Zellen vorhanden sind, maskiert. Daher zeigten die CGH Sammelprofile, im Vergleich zur CGH mehrerer Tausend Zellen, bei der Analyse von weniger als 50 Zellen bestimmte Veränderungen eindeutiger, bzw. wurden Veränderungen überhaupt erst sichtbar (Abbildung 3).

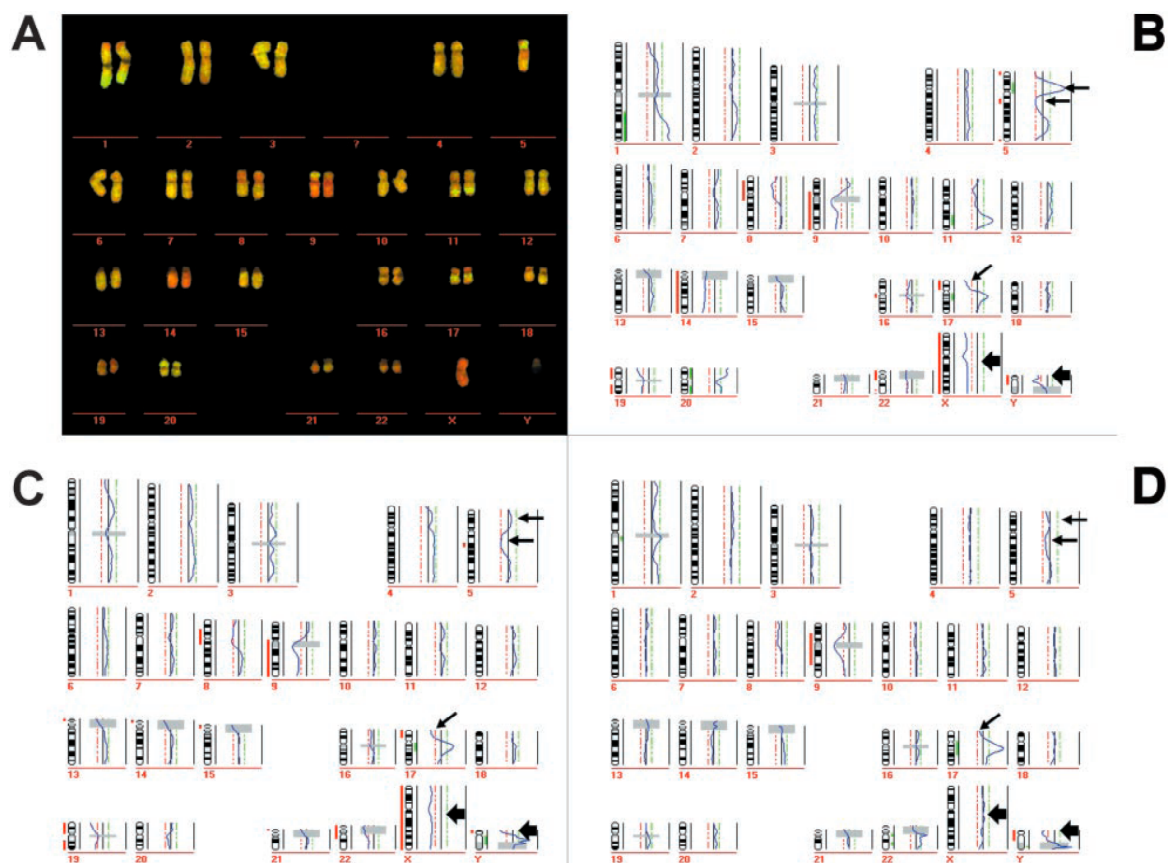


Abbildung 3: CGH von SCOMP amplifizierter DNA eines mikrodisezierten ösophagealen Adenokarzinoms. Karyogramm einer hybridisierten Metaphase (A) und Sammelprofil (B) eines mikrodisezierten Areals von $8000 \mu\text{m}^2$. Die CGH Profile in (C) und (D) wurden von Arealen einer Größe von $40.000 \mu\text{m}^2$ erstellt bzw. von ca. 5×10^5 Zellen. Die Pfeile deuten auf Veränderungen, die bei den kleineren Arealen eindeutiger ausgeprägt sind. Die dicken Pfeile zeigen auf die Veränderungen bei den Geschlechtschromosomen im Falle von Hybridisierungen mit Proben von Patienten unterschiedlichen Geschlechts (B und C), bzw. gleichen Geschlechts (D). Die korrekten Veränderungen an den Geschlechtschromosomen der entsprechend gepaarten Proben, sowie der korrekt angezeigte, bekannte Verlust des Y-Chromosoms, sind Zeichen der guten Qualität dieser CGH-Experimente.

Steigende Lagerungszeiten waren mit einer zunehmenden DNA-Degradierung verbunden und führten damit zum Verlust amplifizierbarer Fragmente. Hiervon waren insbesondere DNA-Fragmente ab einer Länge von mehr als 300 Basenpaaren betroffen. Für die konventionelle CGH ist dies jedoch unproblematisch, da hier das Auflösungsvermögen lediglich bei 10-20 Megabasenpaaren liegt. Bei höher auflösenden genetischen Untersuchungen kann durch Erhöhung der Zellzahl der negative Einfluss der DNA-Degradation kompensiert werden, was aber durch Kontrolluntersuchungen bei jeder Analyse entsprechend abgesichert werden muss. Durch unsere methodischen Anpassungen kann nunmehr das SCOMP Protokoll auch auf FFPGE angewendet werden und ist damit für Vergleiche mit Einzelzellen aus Frischgewebe geeignet. Darüber hinaus ergaben unsere Testreihen, dass SCOMP die derzeit leistungsstärkste Methode für die Amplifikation weniger Zellen aus FFPGE ist, was zwischenzeitlich von unabhängigen Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte [59, 60]. Damit ist das angepasste SCOMP Protokoll nicht nur für Vergleichsuntersuchungen disseminierter Tumorzellen und ihrer Primärtumore geeignet, sondern beispielsweise auch für Analysen der intratumoralen Heterogenität, sowie für die Analyse kleiner dysplastischer Zellgruppen in Tumorstufen hervorragend geeignet.

2.4 *Genetische Analysen disseminierter Tumorzellen beim Ösophaguskarzinom (Anhang 4, [61])*

Mit den beschriebenen neuen technischen Möglichkeiten für den genomischen Vergleich einzelner disseminierter Tumorzellen mit ihren autologen Primärtumoren, haben wir nun die klinisch okkulte systemische Erkrankung und

ihre Beziehung zum Primärtumor beim Ösophaguskarzinom umfassend analysiert [61]. Nach unserer Arbeitshypothese müsste die direkte Charakterisierung früh disseminierter Tumorzellen äußerst informativ für das Aufdecken potentieller Zielstrukturen adjuvanter Therapien sein, da diese das eigentliche therapeutische Ziel darstellen.

Um diese Hypothese zu testen, haben wir eine prospektive Studie an 107 konsekutiven Patienten, die in heilender Absicht einer Ösophagusresektion zugeführt worden waren, durchgeführt. Durch unser experimentelles Vorgehen erhofften wir uns auch neue Einblicke in die Dynamik und Biologie der Progenitorzellen der Metastasen.

Im Rahmen dieser prospektiven Untersuchung wurden Knochenmarksaspirate von 104 Patienten und 35 Einzelzellsuspensionen aus disaggregierten Lymphknoten von 15 dieser Patienten auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Bei drei zusätzlichen Patienten konnten lediglich Lymphknotenpräparationen analysiert werden. In den Knochenmarkspräparationen wurden die disseminierten Tumorzellen mit dem Panzytokeratin Antikörper A45-B/B3 detektiert und in den Lymphknoten kam der anti-EpCAM Antikörper Ber-EP4 zum Einsatz. Die Detektionsrate der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark betrug 37% und in den Lymphknoten 50%. Die positiven Zellen wurden unmittelbar nach der Detektion mittels Mikromanipulation isoliert. Das Genom der isolierten Zellen wurde anschließend nach dem SCOMP Protokoll global amplifiziert und dann mit CGH untersucht. Insgesamt konnten 60 marker-positive Zellen von 35 Ösophaguskarzinom-Patienten isoliert werden und jeweils eine erfolgreiche Einzelzell-CGH

durchgeführt werden (Abbildung 4 A und B). Die CGH Veränderungen der disseminierten Tumorzellen waren grundsätzlich typisch für die entsprechenden Histologien von Adenokarzinom bzw. Plattenepithelkarzinom (Abbildung 4C). Wurde mehr als eine Zelle aus Knochenmark oder Lymphknoten isoliert, so waren sie sich bezüglich der genomischen Veränderungen sehr ähnlich und zeigten in der hierarchischen Clusteranalyse einen hohen Verwandtschaftsgrad (Abbildung 4E). Hiermit konnten die im Kapitel 2.2 beschriebenen initialen Ergebnisse bestätigt werden. Offenbar unterscheidet sich die frühe Phase der systemischen Erkrankung bei Ösophaguskarzinomen deutlich von Mammakarzinomen, bei denen die disseminierten Tumorzellen aus einem Kompartiment untereinander sehr heterogen sind. Ob dies generell ein differentielles Phänomen zwischen sehr aggressiven Karzinomen (Beispiel Ösophaguskarzinom) und weniger aggressiven Karzinomen (Beispiel Mammakarzinom) ist oder ein für die jeweilige Tumorentität typisches Ergebnis darstellt, muss in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden.

Besonders bemerkenswert waren die Untersuchungsergebnisse bei den wenigen Patienten, bei denen disseminierte Tumorzellen sowohl aus Knochenmark, als auch aus Lymphknoten isoliert werden konnten. Denn im Gegensatz zu den ähnlichen Aberrationsmustern bei mehreren Zellen eines Kompartiments, zeigte sich hier eine deutliche Heterogenität. Interessanterweise war dies ein genereller Befund, denn die globalen Aberrationsmuster disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten und disseminierter Tumorzellen aus Knochenmark unterschieden sich deutlich

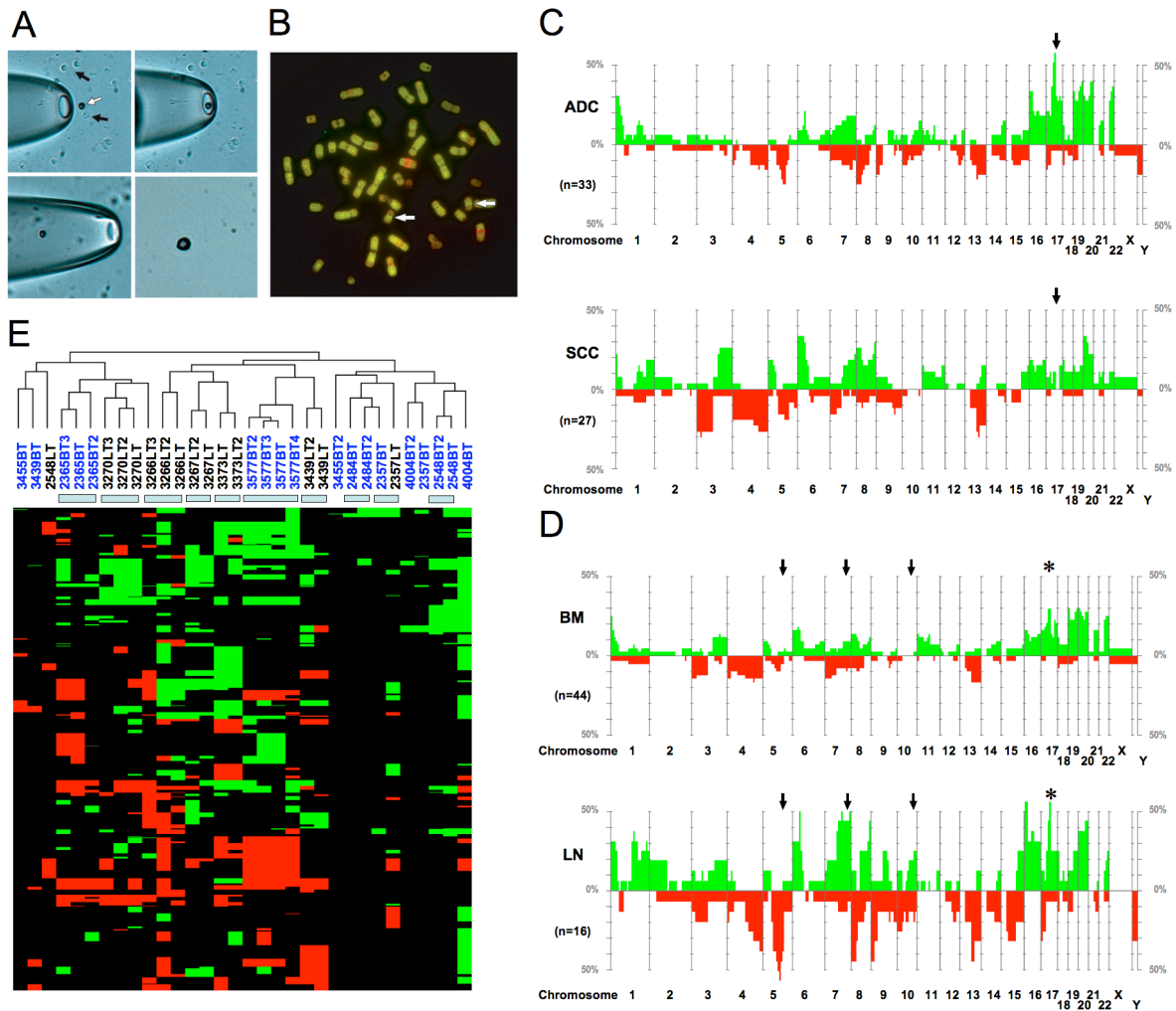


Abbildung 4: (A) Isolationssequenz einer einzelnen zytokeratin-positiven Zelle durch Mikromanipulation (weißer Pfeil: Tumorzelle, schwarze Pfeile: ungefärbte Knochenmarkszellen). Die Zelle wird auf einen neuen Objektträger transferiert, um zu sicherzustellen, dass keine weiteren kontaminierenden Zellen co-isoliert wurden. B: Metaphase die mit einem Einzelzellamplifikat einer Tumorzelle hybridisiert wurde. Die Pfeile zeigen das grün leuchtende Signal bei 17q, welches als HER2 Amplifikation identifiziert wurde. C: Horizontale Histogrammdarstellung der chromosomalen Gewinne (grün) und Verluste (rot) in der CGH Analyse einzelner disseminierter Tumorzellen von Adenokarzinomen (ADC) und Plattenepithelkarzinomen (SCC). Die Pfeile deuten auf die Region 17q12-21. D: Horizontale Histogrammdarstellung der genomischen Profile von einzelnen disseminierten Tumorzellen aus Knochenmark (BM) und Lymphknoten (LN). Die Pfeile deuten auf die Chromosome 5, 7 und 10, die häufig bei Zellen aus Lymphknoten, sehr selten bei Zellen aus Knochenmark verändert waren. Die Sterne kennzeichnen die Region 17q12-21. E: Hierarchische Clusteranalyse disseminierter Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten. Es wurden nur Fälle ausgewählt von bei denen mehr als eine Zelle isoliert wurde. Insgesamt wurden 32 Tumorzellen von 12 Patienten hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit überprüft. Es sind die Fallnummern angegeben, wobei BT Tumorzellen aus Knochenmark und LT Tumorzellen aus Lymphknoten kennzeichnet. Zellen von einem Patienten, die sich einem Cluster befinden, sind mit einem Balken markiert.

voneinander. Die aus Lymphknoten isolierten disseminierten Tumorzellen waren durch eine höhere mittlere chromosomale Aberrationsrate charakterisiert und wiesen Veränderungen auf, wie eine Deletion im Bereich von Chromosom 5q und Amplifikationen bei chromosomalen Regionen von 8q und 9q, die bei Zellen aus dem Knochenmark sehr selten zu beobachten waren (Abbildung 4D). Offensichtlich liegt den Tumorzellen, die entweder hämatogen oder lymphogen metastasieren, eine unterschiedliche Biologie zu Grunde, die sich im chromosomalen Aberrationsmuster widerspiegelt. Das hämatogen disseminierte Tumorzellen deutlich weniger genomische Veränderungen aufweisen, könnte Hinweis auf eine in der Tumorprogression besonders frühe Disseminierung sein, woraufhin diese Tumorzellen möglicherweise in einem Zustand der ‚tumor dormancy‘ arretiert werden.

Die bei den ösophagealen disseminierten Tumorzellen am häufigsten beobachtete Aberration, eine Amplifikation der Region 17q12-21, war zwischen den beiden Hauptwegen der Disseminierung gleich verteilt. Wir nahmen daher an, dass es sich hierbei um eine für die Tumorzelldisseminierung potentiell wichtige Veränderung handelt und haben diese im Folgenden genauer untersucht. Insbesondere, da in dieser Region das HER2 Onkogen lokalisiert ist - ein prognostischer Marker bei verschiedenen malignen Tumoren und zugleich Zielstruktur für molekulare Therapien. Das HER2 Gen kodiert für die Tyrosinkinase HER2/p185, welche die Übertragung von Wachstumssignalen für ein kontrolliertes Zellwachstum mit geregelter Teilungsrate überwacht. Bei 20-30% besonders aggressiver Mamma-Karzinome ist das HER2 Gen amplifiziert, wobei es zu einer Überexpression des HER2-Proteins p185/HER2 und dessen

dauerhafter Aktivierung kommt [62, 63]. Dies führt zu unkontrolliertem Zellwachstum, gesteigerter Proliferation und erhöhtem metastatischem Potential der Tumorzellen. Das von HER2 kodierte Protein ist aber auch das Angriffsziel für den therapeutischen Antikörper Trastuzumab, der bei Mammakarzinom-Patientinnen, deren Tumor eine HER2 Amplifikation aufweist, bereits mit Erfolg eingesetzt wird [64-66].

Auf Grund der niedrigen Auflösung der CGH (10-20 Mb) ist es jedoch nicht möglich vom CGH Profil direkt auf ein betroffenes Gen zu schließen. Daher haben wir eine für das HER2 Gen spezifische quantitative PCR (qPCR) etabliert, die direkt an den Einzelzell-Amplifikaten angewendet werden kann. Die Daten der qPCR Analyse ergaben, dass bei 50% der DNA-Zugewinne der Region 17q12-21 tatsächlich HER2 amplifiziert war. Zusätzlich wurden HER2 Amplifikationen bei Zellen gefunden, die in der CGH keine Amplifikation aufwiesen. Im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen, mit einer Inzidenz von 8%, war die HER2 Genamplifikation bei Adenokarzinomen signifikant häufiger. Hier fanden wir bei disseminierten Tumorzellen dieser Tumorentität eine patientenbezogene HER2 Amplifikationsrate von 38%. Ein deutlich höherer Wert im Vergleich zu den entsprechenden Primärtumoren, wo wir eine Amplifikationsrate von lediglich 18% beobachteten. Eine Subgruppenanalyse zum Vergleich des HER2 Status der disseminierten Tumorzellen mit dem der autologen Primärtumore zeigte eine deutliche Inkongruenz. Besonders interessant war jedoch der Befund, dass die HER2 Amplifikation im Primärtumor keine prognostische Bedeutung hat, während die bei den disseminierten Tumorzellen mit quantitativer PCR festgestellten HER2 Gewinne

einen starken prognostischen Faktor in der Überlebensanalyse darstellten (Abbildung 5).

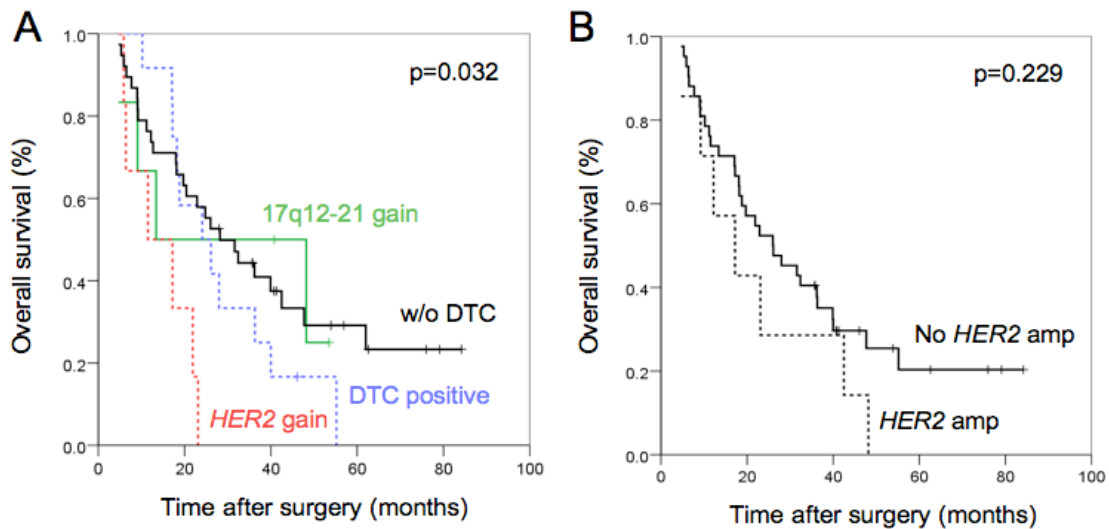


Abbildung 5: Prognostischer Einfluss disseminierter Tumorzellen und deren genetische Veränderungen (A), sowie von HER2 Amplifikationen bei Primärtumoren des prospektiv untersuchten Kollektives (p-Werte: Log-Rang Test; A: drei Freiheitsgrade).

Es stellte sich daher die Frage, ob der Unterschied zwischen den disseminierten Tumorzellen und den autologen Primärtumoren auf HER2 beschränkt ist, oder ob hier globalere Unterschiede bezüglich der genomischen Veränderungen bestehen. Daher haben wir die CGH Profile der disseminierten Tumorzellen mit denen ihrer autologen Primärtumoren mittels einer hierarchischen Clusteranalyse direkt verglichen. Hierbei offenbarte sich eine globale Divergenz zwischen den CGH Veränderungen der disseminierten Tumorzellen und den CGH Alterationen ihrer autologen Primärtumore (Abbildung 6). Insgesamt weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass beim Ösophaguskarzinom offensichtlich die Mehrheit der Tumorzellen des Primärtumors nicht die Tumorzellen der systemischen Erkrankung repräsentieren.

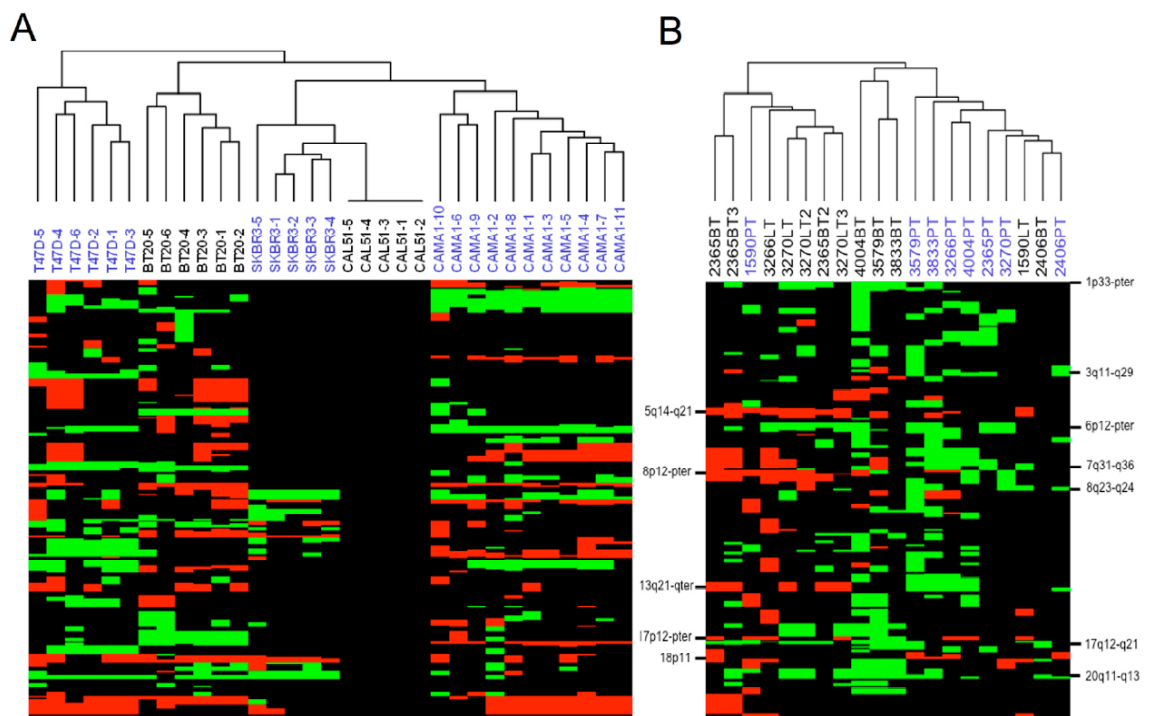


Abbildung 6: A: Hierarchische Clusteranalyse der CGH Veränderungen von 38 Einzelzellen, die von fünf verschiedenen Mamma-Karzinomzelllinien isoliert wurden. Beachtenswert ist die korrekte Gruppierung der Zelllinien anhand der CGH Veränderungen. Die Zelllinie CAL-51 ist chromosomal stabil und zeigt, korrekterweise, keine CGH Veränderungen. B: Hierarchische Clusteranalyse disseminierter Tumorzellen (BT und LT) mit HER2 Amplifikation (qPCR) und der entsprechenden autologen Primärtumore (PT).

Um nun zu überprüfen ob HER2 tatsächlich eine geeignete Zielstruktur bei Ösophaguskarzinomen ist, haben wir an verschiedenen Ösophaguskarzinomzelllinien das Ansprechen auf den therapeutischen Antikörper Trastuzumab getestet. Bei drei Adenokarzinomzelllinien, die eine HER2 Amplifikationen aufwiesen, konnte das Wachstum gut inhibiert werden, während die getesteten Zellen von Plattenepithelkarzinomen ohne HER2 Amplifikation keine Störung der Proliferation zeigten.

Wir testeten zunächst einen der potentiell wichtigsten Wirkmechanismen von Trastuzumab, die Antigen-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Wir konzentrierten

uns hierbei auf zwei besondere Zelllinien, die von einem Patienten mit aggressivem Adenokarzinom generiert wurden. Die eine Zelllinie wurde aus Primärtumorgewebe etabliert (PT1590), die andere ist die bis heute einzige publizierte Zelllinie disseminierter Tumorzellen eines histopathologisch unauffälligen Lymphknoten (LN1590) [20, 67]. Beide Zelllinien weisen eine HER2 Genamplifikation mit Überexpression von HER2/p185 auf. Unsere Daten zeigten nicht nur die sehr gute Bindung des Antikörpers an die Zielzellen, sondern auch deren effektive Lyse. Daher sollten Ösophaguskarzinomzellen mit HER2 Amplifikation ein geeignetes Ziel für die Therapie mit Trastuzumab darstellen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ergab sich aus dem Vergleich, der mit qPCR gemessenen, HER2 Amplifikationsraten disseminierter Tumorzellen von ösophagealen Adenokarzinomen und Mamma-Karzinomen, der klassischen Indikation für derzeitige anti-HER2 Therapien. Bei diesem Vergleich beobachteten wir HER2 Gewinne bei ösophagealen Adenokarzinomen signifikant häufiger (38%) als bei Mamma-Karzinomen (16%). Demnach würden mehr Ösophaguskarzinompatienten als Brustkrebspatientinnen von einer adjuvanten Anti-HER2 Therapie profitieren.

Im Zusammenhang mit der zielgerichteten Therapie haben Untersuchungen wiederholt gezeigt, dass für ein gutes Therapieansprechen die Tumorzellen vom angegriffenen genetischen Defekt abhängig sein müssen. Im Falle der gerichteten Therapie gegen den Epithelial Growths Factor Receptor (EGFR), der bei Kolon- und Lungenkarzinomen sehr häufig überexprimiert ist, konnte nur dann eine Wirksamkeit nachgewiesen werden, wenn das EGFR Gen mutiert

oder amplifiziert war [68, 69]. Auf Grund der überraschenden Divergenz von HER2 zwischen Primärtumoren und ihren disseminierten Tumorzellen wollten wir beispielhaft an den Primärtumorzelllinien PT1590 und der Mikrometastasenzelllinie LN1590 testen, ob beide Zelllinien gleichermaßen von der HER2 Amplifikation abhängig sind.

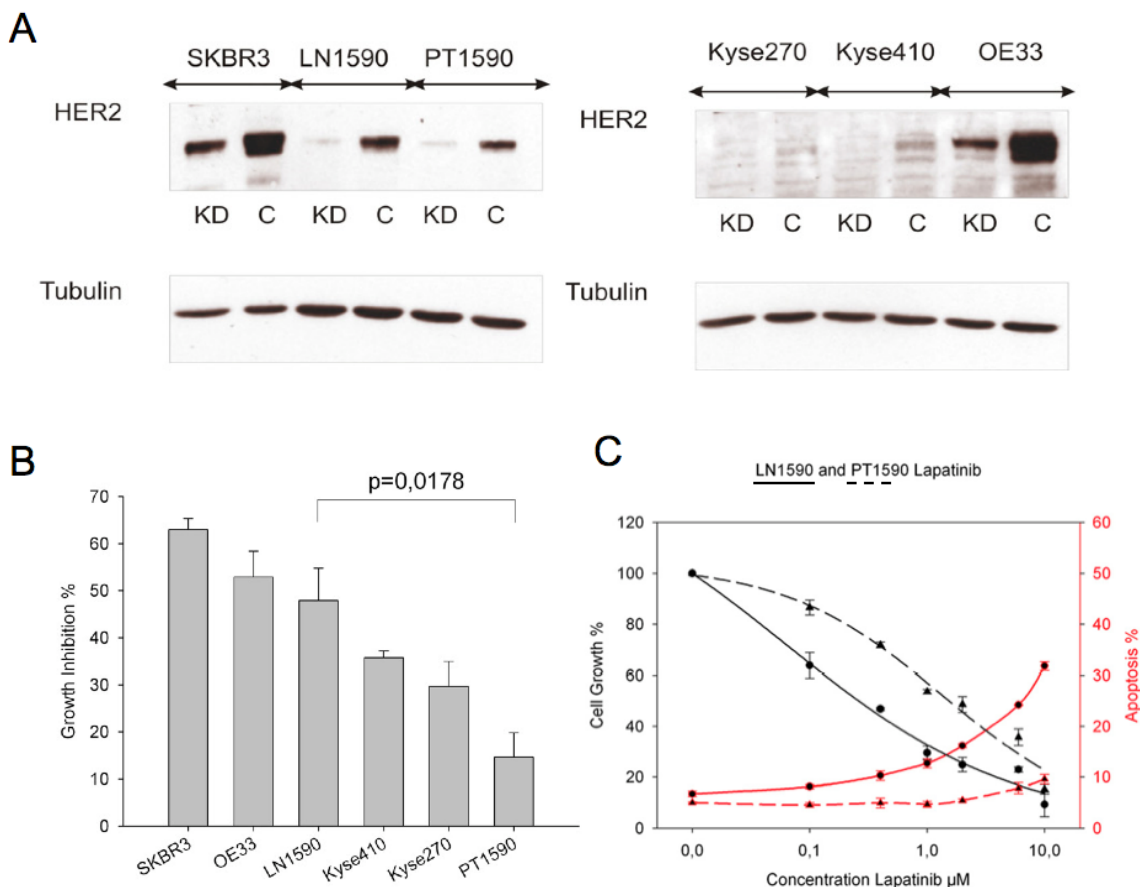


Abbildung 7: Repräsentative Western-Blots der HER2 RNA Interferenzversuche (KD: Knockdown; C: siRNA Kontrolle). Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. B: Mittelwerte und Standardfehler (n=3) der Wachstumsinhibition gemessen mittels MTT-Assay 96h nach ausplattieren der Zellen und 72h nach siRNA Behandlung. C: Wachstumsinhibition (schwarze Linien) und Apoptose (rote Linien) der Zelllinien PT1590 und LN1590 nach Behandlung mit Lapatinib. Kyse270 und Kyse410 sind Zelllinien ösophagealer Plattenepithelkarzinome ohne HER2 Amplifikation, OE33 ist eine ösophageale Adenokarzinomzelllinie mit starker HER2 Amplifikation und SKBR3 ist eine Mamma-Karzinomzelllinie mit HER2 Amplifikation.

Hierfür wurde mittels RNA Interferenz die Expression von HER2/p185 unterdrückt (Abbildung 7A). Hierbei konnte bei vergleichbarem HER2/p185

Ausgangsexpressionsniveau und siRNA Effektivität, eine wesentlich stärkere Wachstumsinhibition und Induktion von Apoptose bei LN1590 im Vergleich zu PT1590 festgestellt werden (Abbildung 7B). Ein deutlicher Hinweis auf die stärkere Abhängigkeit von HER2 bei der Zelllinie, die von disseminierten Tumorzellen etabliert wurde. Diese Daten konnten in weiteren Experimenten bestätigt werden, bei denen der HER2 Signalweg durch die Inhibitoren Erlotinib und Lapatinib (Abbildung 7C), gehemmt worden ist. Die starke HER2-Abhängigkeit war in vitro jedoch nicht nur auf die Zellen der systemischen Erkrankung begrenzt, sondern auch bei einer Primärtumorzelllinie (OE33) zu messen. Dennoch legen die unterschiedlichen Befunde bei PT1590 und LN1590 die interessante, aber auch beunruhigende Möglichkeit nahe, dass der Selektionsdruck bei der systemischen Progression nicht nur zu divergenten genomischen Veränderungen in unterschiedlichen Umgebungen führt, wie die Analyse disseminierter Tumorzellen unterschiedlicher Kompartimente zeigte, sondern auch dazu, dass Gene trotz gleicher Alteration verschiedene Funktionen in der lokalen und systemischen Erkrankung aufweisen können. Es muss jedoch betont werden, dass diese Daten vorläufig sind, da die Zelllinien von Patient 1590 bislang einzigartig sind und keine weiteren von disseminierten Tumorzellen abgeleitete Zelllinien existieren.

Zusammenfassend zeigen die Daten unserer Studie, dass prognostische Marker und therapeutische Zielstrukturen für adjuvante Therapien direkt an disseminierten Tumorzellen identifiziert werden können, die der alleinigen Primärtumoranalyse entgehen. Der unbestrittene Wert von Primärtumorgewebe für die Prognoseabschätzung soll hierbei nicht in Frage gestellt werden, jedoch

scheint die direkte Analyse der Metastasenvorläuferzellen wichtige zusätzliche Informationen insbesondere für die Zielstruktursuche und Validierung adjuvanter Therapien zu bieten.

2.5 *Nachweis und mögliche klinische Bedeutung zirkulierender freier Tumor-DNA beim Ösophaguskarzinom (Anhänge 5 und 6, [70, 71])*

Der zelluläre Nachweis disseminierter Tumorzellen als Grundlage für eine diagnostische Pathologie der systemischen Erkrankung bietet für die Zukunft viele Möglichkeiten, aber auch große technische Herausforderungen. Eine wichtige Problemstellung, die vordringlich gelöst werden muss, ist die Verbesserung der Nachweisfrequenz disseminierter Tumorzellen. Ein weiteres Problem ergibt sich aus dem komplizierten Zugang zu den klassischen Indikatororganen. Die Entnahme von Lymphknoten ist nur bei operativen Eingriffen möglich und die Aspiration von Knochenmark ist, wenn nicht im Rahmen operativer Eingriffe gewonnen, äußerst unangenehm für die Patienten. Für bestimmte, einfache diagnostische Fragestellungen, wie z.B. den Nachweis einer frühen systemischen Erkrankung oder das Abschätzen der minimalen residualen Tumorlast, wäre daher ein Bluttest wünschenswert, der die Patienten nicht belastet und jederzeit wiederholt werden kann. Eine mögliche Grundlage für einen solchen Bluttest könnte der Nachweis freier Tumor DNA im Serum oder Plasma von Krebspatienten sein.

Die Entdeckung freier, nicht zellulärer Nukleinsäuren im menschlichen Plasma wurde bereits im Jahre 1948 beschrieben [72]. Ende der 1970er Jahre wurde von Leon et al. mittels Radioimmunoassay beobachtet, dass die Konzentration freier DNA im Serum von Krebspatienten die von Gesunden um mehr als das

zehnfache übersteigt [73, 74]. War die Natur der erhöhten Serum/Plasma-DNA Konzentrationen bei Krebspatienten lange ungeklärt, konnte in den 1990er Jahren mit Hilfe PCR-basierter Mutationsanalysen der maligne Ursprung belegt werden [75]. Es folgten Studien die auch den Allelverlust (Loss of heterozygosity, LOH) und methylierte DNA-Fragmente als Nachweis für Tumor-DNA verwendet haben [76, 77]. Dennoch ist der Ursprung der freien malignen DNA weiterhin nicht völlig geklärt. Da nach systemischen Chemotherapien ein Rückgang und kein Anstieg der freien DNA gemessen wurde, kann diese nicht nur auf den Zelluntergang im Primärtumor, z.B. im Rahmen der Tumornekrose zurückgeführt werden [75, 78, 79]. Sie scheint eher Ausdruck der hämatogenen Phase der systemischen Erkrankung zu sein und damit auch geeignet, die minimale residuale Tumorlast bei Patienten zu bestimmen.

Wir haben daher bei Patienten mit operablen Ösophaguskarzinomen aus dem Serum DNA extrahiert und diese mit einem Set von 12 Mikrosatellitenmarkern (Abbildung 8) untersucht, um zu testen in welcher Frequenz freie Tumor-DNA zu detektieren ist [70, 71]. Die Auswahl fiel auf diese 12 Mikrosatellitenmarker, da sie in Bereichen von solchen Genen lokalisiert sind, die bei Vorstufen und Primärtumoren von Ösophaguskarzinomen häufig alteriert sind und auch LOH aufweisen [14, 80-86]. Die Marker liegen in den Regionen der Gene p16, TP53, DPC4 und APC, die bei der Entstehung und Progression von Ösophaguskarzinomen beider histologischen Typen als zentral angenommen werden [14, 80-86].

Bei Patienten mit nachweisbarer Tumor DNA sollte überprüft werden, ob diese ein prognostischer Marker für die systemische Progression ist. Mit unserem

Mikrosatellitenmarker-Set haben wir hierfür in zwei Pilotstudien freie Serum-DNA, DNA aus Normalgewebe, sowie aus Tumorgewebe von 28 Patienten mit Plattenepithelkarzinom und 32 Patienten mit Adenokarzinom analysiert.

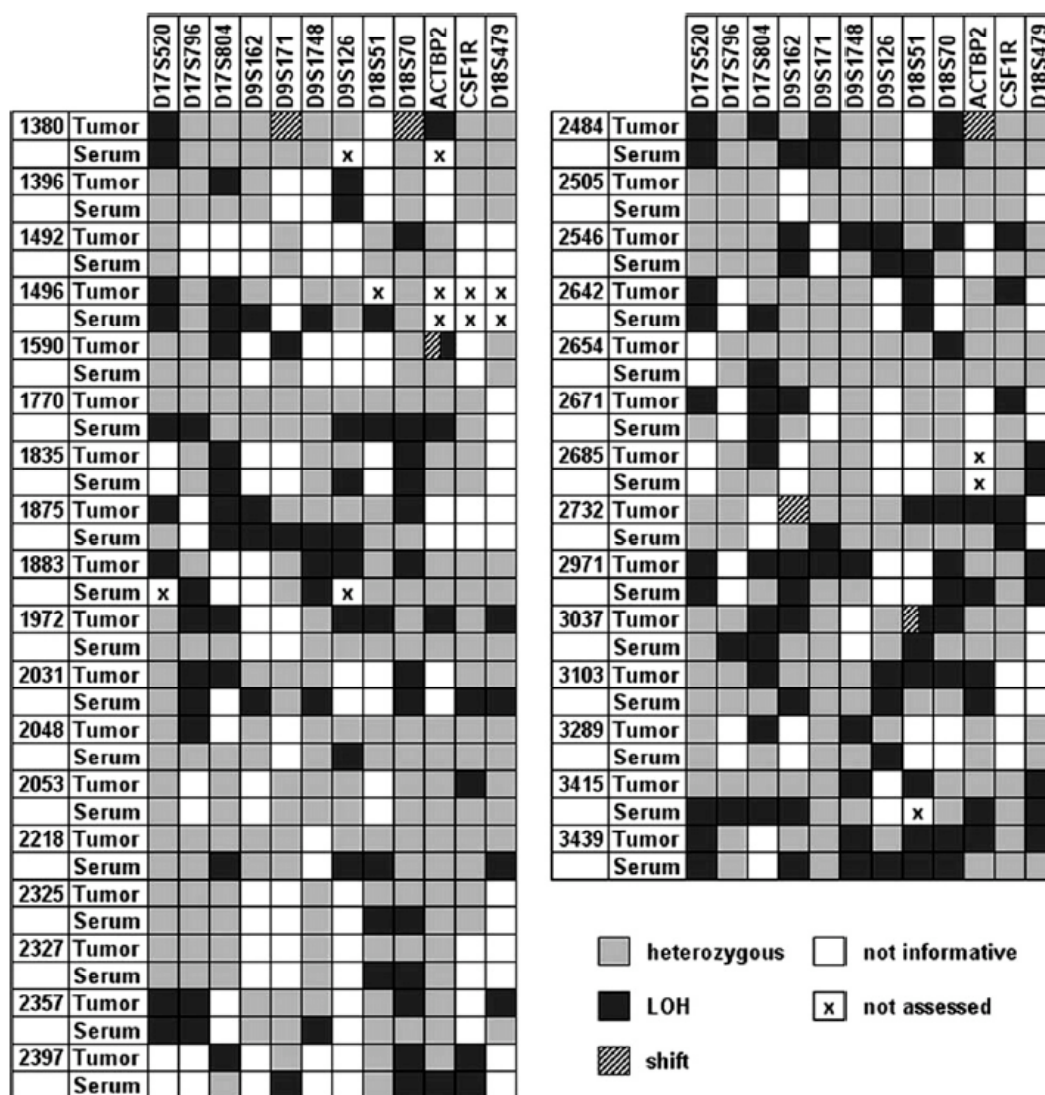


Abbildung 8: Darstellung der Ergebnisse der PCR-Analyse von Mikrosatelliten Markern in Primärtumoren und Serum aller untersuchten ösophagealen Adenokarzinompatienten.

Zum Vergleich wurde Serum-DNA und Lymphozyten DNA von zehn gesunden Spendern untersucht. Während bei den gesunden Spendern in der freien Serum-DNA keine Mikrosatelliten Alterationen beobachtet wurden, fanden wir

bei Plattenepithelkarzinomen in 93% und bei Adenokarzinomen in 81% (Abbildung 8) der Fälle bei mindestens einem Marker Veränderungen. Diese Veränderungen waren überwiegend LOH und, erwartungsgemäß, selten Mikrosatelliteninstabilitäten (Shifts), da die meisten Ösophaguskarzinome zu den chromosomal Instabilen Tumoren gehören. In Korrelation zu den histopathologischen Parametern mit Serum-DNA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In der Überlebensanalyse war sowohl beim Plattenepithelkarzinom wie auch beim Adenokarzinom kein signifikanter Einfluss der Serum Tumor-DNA auf die Prognose feststellbar. Jedoch sind die bisher untersuchten Gruppen dieser Pilotstudien zu klein, um aussagekräftige Daten bei der Überlebensanalyse zu erhalten.

Das für uns wichtigste Ergebnis war die hohe Detektionsrate veränderter DNA bei Tumorpatienten und die Unabhängigkeit vom histopathologischen Primärtumorstadium. Bei nahezu allen sehr kleinen Tumoren (pT1) war Tumor-DNA mit Hilfe unseres Mikrosatellitenmarker-Sets nachweisbar, wobei in der Serum-DNA von Normalspendern keine Alterationen gefunden wurden. Daher könnte der Nachweis freier Tumor-DNA im Serum als mögliche Basis eines Bluttests zur Diagnose ösophagealer Frühkarzinome bei Risikogruppen geeignet sein. Da die endoskopische Überwachung von Risikopatienten sehr aufwendig ist und typische klinische Symptome bei Ösophaguskarzinomen häufig erst bei weit fortgeschrittener Erkrankung auftreten und daher für viele Patienten eine kurative Therapie nicht möglich ist, wäre ein solcher diagnostischer Bluttest von großer klinischen Bedeutung. Um die diagnostische, aber auch die mögliche prognostische Wertigkeit unseres Tests abschließend

beurteilen zu können müssen Nachfolgestudien an unabhängigen und größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden.

3. Zusammenfassung

Nach operativer Entfernung von Ösophaguskarzinomen mit kurativer Intention bleibt offensichtlich bei den meisten Patienten eine bereits disseminierte, minimale Resterkrankung zurück, die mit konventioneller Diagnostik nicht erkannt werden kann. Diese Zellpopulation bildet den Ausgangspunkt für die späteren Metastasen. Wir haben daher versucht, mit molekularen Methoden die klinisch okkulte systemische Erkrankung nachzuweisen und zu prüfen, ob sie einen geeigneten prognostischen und auch therapeutischen Marker darstellt.

Zum einen haben wir zirkulierende, extrazelluläre Tumor-DNA im Serum als Korrelat der Systemerkrankung getestet. Diese war in unseren Pilotstudien kein prognostischer Marker, jedoch könnte unser Nachweisverfahren als Basis für einen Bluttest zur frühen Diagnose von Ösophaguskarzinomen dienen.

Zum anderen haben wir mittels Immundetektion die frühe Systemerkrankung auf zellulärer Ebene nachgewiesen, wobei sich disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten als starker prognostischer Faktor erwiesen haben. Die genaue Analyse des metastatischen Ausbreitungsmusters zeigte ein häufiges Überspringen von Lymphknotenstationen und bekräftigte die Wichtigkeit einer radikalen und systematischen Lymphknotenentfernung bei der Resektion von Ösophaguskarzinomen. Der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten könnte zu einem verfeinerten Tumorstaging beitragen.

Den Schwerpunkt der Arbeiten bildete die direkte genomische Charakterisierung einzelner früh disseminierter Tumorzellen. Im Rahmen dieser Projektarbeiten konnte auch ein neues Protokoll zur Amplifikation weniger Zellen aus formalinfixiertem und paraffineingebetteten Gewebe etabliert werden, welches die globale Genomamplifikation von nur 20 Zellen aus solchen Geweben erlaubt. Die Untersuchungsergebnisse der genetischen Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen zeigten erstmals, dass es sich bei den disseminierten Tumorzellen nicht um eine selektierte homogene Population, sondern um genetisch heterogene Zellen handelt. Bei einer prospektiven Analyse an Ösophaguskarzinompatienten zeigte sich in Bezug auf die genomischen Veränderungen disseminierter Tumorzellen nicht nur eine starke Divergenz zwischen lokaler und systemischer Erkrankung, sondern auch zwischen früher lymphatischer und hämatogener Disseminierung. Trotz dieser Divergenz konnten wir eine genetische Veränderung identifizieren, die bei den Zellen beider Metastasierungswege ähnlich häufig war. Interessanterweise war innerhalb dieser Amplifikation das HER2 Gen lokalisiert - eine wichtige therapeutische Zielstruktur. Unsere Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass eine gegen HER2 gerichtete adjuvante Tumorthérapie bei Ösophaguskarzinompatienten äußerst sinnvoll ist. Insgesamt zeigen die Daten der direkten genetischen Analyse disseminierter Tumorzellen, dass die Mehrheit der Zellen des Primärtumors die systemische Erkrankung nur unzureichend repräsentiert. Daher scheint die direkte Analyse der systemischen Erkrankung insbesondere zur Planung und Validierung effektiver adjuvanter Therapien unabdingbar.

4. Abkürzungen

UICC – Union international contre le cancer

CGH – Comparative Genomic Hybridization

PCR – Polymerase chain reaction

SCOMP – Bezeichnung für Adapter-Linker PCR (Abkürzung leitet sich ab von Single cell *COM*Parative genomic hybridization)

FFPGE – Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe

DOP-PCR – Degenerated oligoneucleotide primed PCR

DNA – Deoxyribonucleic acid

LOH – Loss of heterozygosity

siRNA – small interfering ribonucleic acid

5. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel bedanken. Er hat meine wissenschaftlichen Tätigkeiten über lange Jahre angeregt, gefördert, sowie mein Habilitationsvorhaben kräftig unterstützt. Besonders dankbar bin ich ihm aber für sein stets offenes Ohr und seine vielen freundschaftlichen Ratschläge, die auch wichtige Entscheidungsgrundlagen bei meinem Fortkommen waren.

Ein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Mentor Herrn Prof. Dr. med. Christoph Klein, der mich für die Biologie und die Charakterisierung der systemischen Erkrankung bei soliden Malignomen begeistert hat und mit dem ich an wesentlichen Projekten, die dieser Habilitation zu Grunde liegen, zusammengearbeitet habe. Besonders freut mich, dass aus dem gemeinsamen wissenschaftlichen Arbeiten eine Freundschaft gewachsen ist.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen ehemaligen Kollegen und Freunden der AG Klein am Institut für Immunologie der LMU München Herrn Dr. rer. nat. Oleg Schmidt-Kittler, Herrn Thomas Blankenstein und Herrn Manfred Meyer für die vielen fruchtbaren Diskussionen danken, die nicht ausschließlich im Institut, sondern auch in der inspirierenden Atmosphäre des Mariandl stattfanden.

Herrn Prof. Dr. med. Hosch möchte ich ebenfalls für die anhaltende, freundschaftliche Förderung meines Forschungsinteresses danken und dafür, dass er mich bereits früh - im Rahmen meiner Promotionsarbeit - für wichtige Problemstellung in der chirurgischen Onkologie sensibilisiert hat. Meinen klinisch-wissenschaftlichen Arbeitskollegen und Freunden Herrn PD Dr. med.

Eisenberger, Herrn Dr. med. Alexander Rehders und Herrn Dr. med. Scheunemann danke ich ebenfalls für die gute langjährige Zusammenarbeit, die auch entscheidende Daten für die Erstellung dieser Habilitationsarbeit hervorbrachte.

Für die offenen und konstruktiven wissenschaftliche Kooperationen in den Projektarbeiten, durch die ich auch immer sehr viel lernte, möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. med. Baldus, Herrn PD Dr. med. Andreas Erbersdobler, Herrn Dr. med. Winfried Schraut und Herrn Pablo Verde danken.

Allen anderen, hier nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen (insbesondere alle Koautoren der Arbeiten im Anhang), die an den Forschungsprojekten beteiligt waren und damit auch zum Gelingen dieser Habilitation beigetragen haben, möchte ich selbstverständlich auch meinen Dank für die konstruktive Zusammenarbeit aussprechen.

Meiner lieben Frau Kipum danke ich ganz herzlich für ihr Verständnis bei langen Arbeitsnächten und -wochenenden, sowie für ihre Ermunterungen in meinen schwachen Stunden. Meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle Unterstützung meiner Entwicklung bis zum heutigen Tage und natürlich für das hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir eine freie und selbständige Forschung ermöglichte.

6. Literatur

1. Kleinberg, L. and A.A. Forastiere, *Chemoradiation in the Management of Esophageal Cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(26): p. 4110-4117.
2. Kelsen, D.P., K.A. Winter, L.L. Gunderson, J. Mortimer, N.C. Estes, D.G. Haller, J.A. Ajani, W. Kocha, B.D. Minsky, J.A. Roth, and C.G. Willett, *Long-Term Results of RTOG Trial 8911 (USA Intergroup 113): A Random Assignment Trial Comparison of Chemotherapy Followed by Surgery Compared With Surgery Alone for Esophageal Cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(24): p. 3719-3725.
3. Bedenne, L., P. Michel, O. Bouche, C. Milan, C. Mariette, T. Conroy, D. Pezet, B. Roullet, J.-F. Seitz, J.-P. Herr, B. Paillot, P. Arveux, F. Bonnetain, and C. Binquet, *Chemoradiation Followed by Surgery Compared With Chemoradiation Alone in Squamous Cancer of the Esophagus: FFCD 9102*. J Clin Oncol, 2007. **25**(10): p. 1160-1168.
4. Feith, M., H.J. Stein, and J.R. Siewert, *Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: surgical therapy based on 1602 consecutive resected patients*. Surg Oncol Clin N Am, 2006. **15**(4): p. 751-64.
5. Stahl, M., M. Stuschke, N. Lehmann, H.-J. Meyer, M.K. Walz, S. Seeber, B. Klump, W. Budach, R. Teichmann, M. Schmitt, G. Schmitt, C. Franke, and H. Wilke, *Chemoradiation With and Without Surgery in Patients With Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus*. J Clin Oncol, 2005. **23**(10): p. 2310-2317.
6. Malthaner, R.A., R.K. Wong, R.B. Rumble, and L. Zuraw, *Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis*. BMC Med, 2004. **2**(1): p. 35.
7. Enzinger, P.C. and R.J. Mayer, *Esophageal cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(23): p. 2241-52.
8. Hulscher, J.B., J.W. van Sandick, A.G. de Boer, B.P. Wijnhoven, J.G. Tijssen, P. Fockens, P.F. Stalmeier, F.J. ten Kate, H. van Dekken, H. Obertop, H.W. Tilanus, and J.J. van Lanschot, *Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus*. N Engl J Med, 2002. **347**(21): p. 1662-9.
9. Hulscher, J.B., J.W. van Sandick, J.G. Tijssen, H. Obertop, and J.J. van Lanschot, *The recurrence pattern of esophageal carcinoma after transhiatal resection*. J Am Coll Surg, 2000. **191**(2): p. 143-8.
10. van de Ven, C., P. De Leyn, W. Coosemans, D. Van Raemdonck, and T. Lerut, *Three-field lymphadenectomy and pattern of lymph node spread in T3 adenocarcinoma of the distal esophagus and the gastro-esophageal junction*. Eur J Cardiothorac Surg, 1999. **15**(6): p. 769-73.
11. Lerut, T. and G. Decker, *Esophageal cancer*. Curr Opin Gastroenterol, 1999. **15**(4): p. 364-9.
12. DeMeester, S.R., *Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(1): p. 12-30.
13. Siewert, J.R. and K. Ott, *Are Squamous and Adenocarcinomas of the Esophagus the Same Disease?* Seminars in Radiation Oncology, 2007. **17**(1): p. 38-44.

14. Paulson, T.G. and B.J. Reid, *Focus on Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 11-16.
15. *UICC - TNM Classification of Malignant Tumours*. 6th ed, ed. L.H. Sobin and C. Wittekind. 2002, New York: Wiley-Liss.
16. Altorki, N.K., *Three-field lymphadenectomy for esophageal cancer*. Chest Surg Clin N Am, 2000. **10**(3): p. 553-60.
17. Hosch, S.B., N.H. Stoecklein, U. Pichlmeier, A. Rehders, P. Scheunemann, A. Niendorf, W.T. Knoefel, and J.R. Izbicki, *Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance*. J Clin Oncol, 2001. **19**(7): p. 1970-5.
18. Hosch, S.B., N.H. Stoecklein, and J.R. Izbicki, *Molecular markers and staging of early esophageal cancer*. Langenbecks Arch Surg, 2003. **388**(2): p. 77-82.
19. Glickman, J.N., C. Torres, H.H. Wang, J.R. Turner, A. Shahsafaei, W.G. Richards, D.J. Sugarbaker, and R.D. Odze, *The prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with esophageal carcinoma*. Cancer, 1999. **85**(4): p. 769-78.
20. Hosch, S., J. Kraus, P. Scheunemann, J.R. Izbicki, C. Schneider, U. Schumacher, K. Witter, M.R. Speicher, and K. Pantel, *Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6836-40.
21. Kijima, F., S. Natsugoe, S. Takao, K. Aridome, M. Baba, M. Yoshifumi, Y. Eizuru, and T. Aikou, *Detection and clinical significance of lymph node micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with esophageal carcinoma*. Oncology, 2000. **58**(1): p. 38-44.
22. Sato, F., Y. Shimada, Z. Li, G. Watanabe, M. Maeda, and M. Imamura, *Lymph node micrometastasis and prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Surg, 2001. **88**(3): p. 426-32.
23. Mueller, J.D., H.J. Stein, T. Oyang, S. Natsugoe, M. Feith, M. Werner, and J. Rudiger Siewert, *Frequency and clinical impact of lymph node micrometastasis and tumor cell microinvolvement in patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction*. Cancer, 2000. **89**(9): p. 1874-82.
24. Izbicki, J.R., S.B. Hosch, U. Pichlmeier, A. Rehders, C. Busch, A. Niendorf, B. Passlick, C.E. Broelsch, and K. Pantel, *Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer*. N Engl J Med, 1997. **337**(17): p. 1188-94.
25. Altorki, N.K., *Extended resections in the management of esophageal carcinoma*. Curr Opin Gen Surg, 1994: p. 113-6.
26. Baba, M., T. Aikou, S. Natsugoe, C. Kusano, M. Shimada, S. Nakano, T. Fukumoto, and H. Yoshinaka, *Quality of life following esophagectomy with three-field lymphadenectomy for carcinoma, focusing on its relationship to vocal cord palsy*. Dis Esophagus, 1998. **11**(1): p. 28-34.
27. Bhansali, M.S., H. Fujita, T. Kakegawa, H. Yamana, T. Ono, S. Hikita, Y. Toh, T. Fujii, U. Tou, and K. Shirouzu, *Pattern of recurrence after*

- extended radical esophagectomy with three-field lymph node dissection for squamous cell carcinoma in the thoracic esophagus.* World J Surg, 1997. **21**(3): p. 275-81.
28. Fang, W., H. Igaki, Y. Tachimori, H. Sato, H. Daiko, and H. Kato, *Three-field lymph node dissection for esophageal cancer in elderly patients over 70 years of age.* Ann Thorac Surg, 2001. **72**(3): p. 867-71.
 29. Fujita, H., T. Kakegawa, H. Yamana, I. Shima, Y. Toh, Y. Tomita, T. Fujii, K. Yamasaki, K. Higaki, T. Noake, and et al., *Mortality and morbidity rates, postoperative course, quality of life, and prognosis after extended radical lymphadenectomy for esophageal cancer. Comparison of three-field lymphadenectomy with two-field lymphadenectomy.* Ann Surg, 1995. **222**(5): p. 654-62.
 30. Hennessy, T.P., *The significance of three-field lymphadenectomy in oesophageal cancer surgery.* Surg Oncol, 1994. **3**(5): p. 251-3.
 31. Hennessy, T.P., *Lymph node dissection.* World J Surg, 1994. **18**(3): p. 367-72.
 32. Horstmann, O., P.R. Verreet, H. Becker, C. Ohmann, and H.D. Roher, *Transhiatal oesophagectomy compared with transthoracic resection and systematic lymphadenectomy for the treatment of oesophageal cancer.* Eur J Surg, 1995. **161**(8): p. 557-67.
 33. Isono, K., T. Ochiai, K. Okuyama, and S. Onoda, *The treatment of lymph node metastasis from esophageal cancer by extensive lymphadenectomy.* Jpn J Surg, 1990. **20**(2): p. 151-7.
 34. Isono, K., H. Sato, and K. Nakayama, *Results of a nationwide study on the three-field lymph node dissection of esophageal cancer.* Oncology, 1991. **48**(5): p. 411-20.
 35. Khan, T.F., *Long-term results of subtotal esophagectomy with three-field lymphadenectomy for carcinoma of the thoracic esophagus.* Ann Surg, 1995. **221**(4): p. 432.
 36. Law, S. and J. Wong, *Two-field dissection is enough for esophageal cancer.* Dis Esophagus, 2001. **14**(2): p. 98-103.
 37. Lerut, T., W. Coosemans, P. De Leyn, G. Decker, G. Deneffe, and D. Van Raemdonck, *Is there a role for radical esophagectomy.* Eur J Cardiothorac Surg, 1999. **16 Suppl 1**: p. S44-7.
 38. Mueller, J.M., M. Merkel, and U. Zieren, *Principles of radical oesophageal surgery.* Endosc Surg Allied Technol, 1994. **2**(1): p. 3-9.
 39. Okuma, T., H. Kaneko, M. Yoshioka, Y. Torigoe, and Y. Miyauchi, *Prognosis in esophageal carcinoma with cervical lymph node metastases.* Surgery, 1993. **114**(3): p. 513-8.
 40. Siewert, J.R. and H.J. Stein, *Lymph-node dissection in squamous cell esophageal cancer -- who benefits?* Langenbecks Arch Surg, 1999. **384**(2): p. 141-8.
 41. Stein, H.J., M. Feith, J. Mueller, M. Werner, and J.R. Siewert, *Limited resection for early adenocarcinoma in Barrett's esophagus.* Ann Surg, 2000. **232**(6): p. 733-42.
 42. Tsurumaru, M., Y. Kajiyama, H. Udagawa, and H. Akiyama, *Outcomes of extended lymph node dissection for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus.* Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **7**(6): p. 325-9.

43. Watanabe, H., H. Kato, and Y. Tachimori, *Significance of extended systemic lymph node dissection for thoracic esophageal carcinoma in Japan*. Recent Results Cancer Res, 2000. **155**: p. 123-33.
44. Gervasoni, J.E., Jr., C. Taneja, M.A. Chung, and B. Cady, *Biologic and clinical significance of lymphadenectomy*. Surg Clin North Am, 2000. **80**(6): p. 1631-73.
45. Kitagawa, Y., M. Ohgami, H. Fujii, M. Mukai, T. Kubota, N. Ando, M. Watanabe, Y. Otani, S. Ozawa, H. Hasegawa, T. Furukawa, J. Matsuda, K. Kumai, T. Ikeda, A. Kubo, and M. Kitajima, *Laparoscopic detection of sentinel lymph nodes in gastrointestinal cancer: a novel and minimally invasive approach*. Ann Surg Oncol, 2001. **8**(9 Suppl): p. 86S-89S.
46. Matsubara, T., M. Ueda, S. Kaisaki, J. Kuroda, C. Uchida, N. Kokudo, T. Takahashi, T. Nakajima, and A. Yanagisawa, *Localization of initial lymph node metastasis from carcinoma of the thoracic esophagus*. Cancer, 2000. **89**(9): p. 1869-73.
47. Nomura, T., M. Onda, M. Miyashita, H. Makino, H. Maruyama, S. Nagasawa, R. Futami, K. Yamashita, K. Takubo, and K. Sasajima, *Wide-spread distribution of sentinel lymph nodes in esophageal cancer*. J Nippon Med Sch, 2001. **68**(5): p. 393-6.
48. Yasuda, S., H. Shimada, K. Ogoshi, H. Tanaka, Y. Kise, T. Kenmochi, J. Soeda, K. Nakamura, Y. Kato, H. Kijima, Y. Suzuki, H. Fujii, T. Tajima, and H. Makuuchi, *Preliminary study for sentinel lymph node identification with Tc-99m tin colloid in patients with esophageal or gastric cancer*. Tokai J Exp Clin Med, 2001. **26**(1): p. 15-8.
49. Klein, C.A., T.J. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler, M. Petronio, B. Polzer, N.H. Stoecklein, and G. Riethmuller, *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
50. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
51. Thorban, S., R. Rosenberg, R. Busch, and R.J. Roder, *Epithelial cells in bone marrow of oesophageal cancer patients: a significant prognostic factor in multivariate analysis*. Br J Cancer, 2000. **83**(1): p. 35-9.
52. Klein, C.A., O. Schmidt-Kittler, J.A. Schardt, K. Pantel, M.R. Speicher, and G. Riethmuller, *Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4494-9.
53. Stoecklein, N.H., A. Erbersdobler, O. Schmidt-Kittler, J. Diebold, J.A. Schardt, J.R. Izbickei, and C.A. Klein, *SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples*. Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 43-51.
54. Barbaux, S., O. Poirier, and F. Cambien, *Use of degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) for the genotyping of low-concentration DNA samples*. J Mol Med, 2001. **79**(5-6): p. 329-32.
55. Kuukasjarvi, T., M. Tanner, S. Pennanen, R. Karhu, T. Visakorpi, and J. Isola, *Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA*

- samples in comparative genomic hybridization*. Genes Chromosomes Cancer, 1997. **18**(2): p. 94-101.
56. Larsen, J., A.M. Ottesen, C. Lundsteen, H. Leffers, and J.K. Larsen, *Optimization of DOP-PCR amplification of DNA for high-resolution comparative genomic hybridization analysis*. Cytometry, 2001. **44**(4): p. 317-25.
 57. Telenius, H., N.P. Carter, C.E. Bebb, M. Nordenskjold, B.A. Ponder, and A. Tunnacliffe, *Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer*. Genomics, 1992. **13**(3): p. 718-25.
 58. Speicher, M.R., S. du Manoir, E. Schrock, H. Holtgreve-Grez, B. Schoell, C. Lengauer, T. Cremer, and T. Ried, *Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA- amplification*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(11): p. 1907-14.
 59. Ghazani, A.A., N.C.R. Arneson, K. Warren, and S.J. Done, *Limited tissue fixation times and whole genomic amplification do not impact array CGH profiles*. J Clin Pathol, 2006. **59**(3): p. 311-315.
 60. Pirker, C., M. Raidl, E. Steiner, L. Elbling, K. Holzmann, S. Spiegl-Kreinecker, M. Aubele, C. Grasl-Kraupp, C. Marosi, M. Micksche, and W. Berger, *Whole genome amplification for CGH analysis: Linker-adaptor PCR as the method of choice for difficult and limited samples*. Cytometry Part A, 2004. **61A**(1): p. 26-34.
 61. Stoecklein, N.H., S.B. Hosch, M. Bezler, F. Stern, C. Hartmann, C. Vay, A. Siegmund, P. Scheunemann, W.T. Knoefel, P.E. Verde, U. Reichelt, A. Erbersdobler, A. Ullrich, J.R. Izbickei, and C.A. Klein, *Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction outcome and therapy selection in esophageal cancer*. Submitted to Cancer Cell, 2008.
 62. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-54.
 63. Medinger, M. and J. Dreves, *Receptor tyrosine kinases and anticancer therapy*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(9): p. 1139-49.
 64. Pegram, M.D., T. Pienkowski, D.W. Northfelt, W. Eiermann, R. Patel, P. Fumoleau, E. Quan, J. Crown, D. Toppmeyer, M. Smylie, A. Riva, S. Blitz, M.F. Press, D. Reese, M.A. Lindsay, and D.J. Slamon, *Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(10): p. 759-69.
 65. Slamon, D.J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton, *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
 66. Vogel, C.L., M.A. Cobleigh, D. Tripathy, J.C. Gutheil, L.N. Harris, L. Fehrenbacher, D.J. Slamon, M. Murphy, W.F. Novotny, M. Burchmore, S. Shak, S.J. Stewart, and M. Press, *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(3): p. 719-26.

67. Scheunemann, P., J.R. Izbicki, and K. Pantel, *Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes*. N Engl J Med, 1999. **340**(21): p. 1687.
68. Lynch, T.J., D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Haserlat, J.G. Supko, F.G. Haluska, D.N. Louis, D.C. Christiani, J. Settleman, and D.A. Haber, *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
69. Moroni, M., S. Veronese, S. Benvenuti, G. Marrapese, A. Sartore-Bianchi, F. Di Nicolantonio, M. Gambacorta, S. Siena, and A. Bardelli, *Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study*. Lancet Oncol, 2005. **6**(5): p. 279-86.
70. Eisenberger, C.F., W.T. Knoefel, M. Peiper, P. Merkert, E.F. Yekebas, P. Scheunemann, K. Steffani, N.H. Stoecklein, S.B. Hosch, and J.R. Izbicki, *Squamous cell carcinoma of the esophagus can be detected by microsatellite analysis in tumor and serum*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(11): p. 4178-83.
71. Eisenberger, C.F., N.H. Stoecklein, S. Jazra, S.B. Hosch, M. Peiper, P. Scheunemann, J.S. Am Esch, and W.T. Knoefel, *The detection of oesophageal adenocarcinoma by serum microsatellite analysis*. Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(9): p. 954-60.
72. Mandel, P. and P. Métais, *Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme*. CR Acad Sci Paris, 1948. **142**: p. 241-243.
73. Leon, S.A., B. Shapiro, G. Kollmann, and A. Green, *A comparison of methods for labelling DNA for use in the radioimmunoassay of DNA-antibodies*. J Immunol Methods, 1974. **5**(1): p. 1-8.
74. Leon, S.A., A. Green, M.J. Yaros, and B. Shapiro, *Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA*. J Immunol Methods, 1975. **9**(2): p. 157-64.
75. Yamada, T., S. Nakamori, H. Ohzato, S. Oshima, T. Aoki, N. Higaki, K. Sugimoto, K. Akagi, Y. Fujiwara, I. Nishisho, M. Sakon, M. Gotoh, and M. Monden, *Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(6): p. 1527-32.
76. Sidransky, D., *Nucleic acid-based methods for the detection of cancer*. Science, 1997. **278**(5340): p. 1054-9.
77. Wong, I.H., Y.M. Lo, and P.J. Johnson, *Epigenetic tumor markers in plasma and serum: biology and applications to molecular diagnosis and disease monitoring*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **945**: p. 36-50.
78. Frickhofen, N., E. Muller, M. Sandherr, T. Binder, M. Bangerter, C. Wiest, M. Enz, and H. Heimpel, *Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia*. Blood, 1997. **90**(12): p. 4953-60.
79. Gonzalez, R., J.M. Silva, A. Sanchez, G. Dominguez, J.M. Garcia, X.Q. Chen, M. Stroun, M. Provencio, P. Espana, P. Anker, and F. Bonilla, *Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-*

- cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance.* Ann Oncol, 2000. **11**(9): p. 1097-104.
80. Fitzgerald, R.C., *Genetics and prevention of oesophageal adenocarcinoma.* Recent Results Cancer Res, 2005. **166**: p. 35-46.
 81. Jankowski, J.A., N.A. Wright, S.J. Meltzer, G. Triadafilopoulos, K. Geboes, A.G. Casson, D. Kerr, and L.S. Young, *Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus.* Am J Pathol, 1999. **154**(4): p. 965-73.
 82. Montesano, R. and P. Hainaut, *Molecular precursor lesions in oesophageal cancer.* Cancer Surv, 1998. **32**: p. 53-68.
 83. Montesano, R., M. Hollstein, and P. Hainaut, *Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review.* Int J Cancer, 1996. **69**(3): p. 225-35.
 84. Wijnhoven, B.P., H.W. Tilanus, and W.N. Dinjens, *Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma.* Ann Surg, 2001. **233**(3): p. 322-37.
 85. Allen, J.W., J.D. Richardson, and M.J. Edwards, *Squamous cell carcinoma of the esophagus: a review and update.* Surg Oncol, 1997. **6**(4): p. 193-200.
 86. Sarbia, M. and H.E. Gabbert, *Modern pathology: prognostic parameters in squamous cell carcinoma of the esophagus.* Recent Results Cancer Res, 2000. **155**: p. 15-27.

7. Anhang

Arbeiten, die dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrunde liegen:

- Anhang 1: Hosch SB, **Stoecklein NH**, Pichlmeier U, Rehders A, Scheunemann P, Niendorf P, Knoefel WT, Izbicki JR: Esophageal cancer: The mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance, Journal Of Clinical Oncology 2001, 19:1970-1975 (IF 13.6)
- Anhang 2: Klein CA, Blankenstein TJF, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, **Stoecklein NH**, Riethmuller G: Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer, Lancet 2002, 360:683-689 (IF 25.8)
- Anhang 3: **Stoecklein NH**, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izbicki JR, Klein CA: SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples, American Journal Of Pathology 2002, 161:43-51 (IF 5.9)
- Anhang 4: **Stoecklein NH**, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann C, Siegmund A, Scheunemann P, Knoefel WT, Verde PE, Erbersdobler A, Ullrich A, Izbicki JR, Klein CA: Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. Cancer Cell 2008 May;13:441-453 (IF 23.9)
- Anhang 5: Eisenberger CF, Knoefel WT, Peiper M, Merkert P, Yekebas EF, Scheunemann P, Steffani K, **Stoecklein NH**, Hosch SB, Izbicki JR: Squamous cell carcinoma of the esophagus can be detected by microsatellite analysis in tumor and serum, Clinical Cancer Research 2003, 9:4178-4183 (IF 6.2)
- Anhang 6: Eisenberger CF*, **Stoecklein NH***, Jasra S, Hosch SB, Peiper M, Scheunemann P, Schulte am Esch J, Knoefel WT: The detection of oesophageal adenocarcinoma by serum microsatellite analysis, Eur J Surg Oncol. 2006 Apr 3 (IF 1.9) **Erstautoren*